

1) Family number: 12718685 (**CN1245218 A**)

Title:	Solid-phase one-by-one base nucleic acid analysis method and its instrument			
Family:	Publication number	Publication date	Application number	Application date
	CN1245218 A	20000223	CN19981017403	19980819

Assignee(s):(std): INST OF RADIO MEDICINE ACADEMY

Assignee(s): INST OF RADIO MEDICINE ACADEMY OF MILITARY

Inventor(s):(std): WANG SHENGQI

Inventor(s): SHENGQI WANG

International class (IPC 8): C12Q1/00 (Advanced/Invention);
C12Q1/00 (Core/Invention)

International class (IPC 1-7): C12Q1/00

Abstract:
Source: CN1245218A The present invention relates to a new nucleic acid sequence analysis technique, principle and equipment, which are different from existing ones in that it can realize large-scale sequence analysis of nucleic acid and mutation detection. Said technique has important application prospect in genome project, heritable disease analysis, gene diagnosis and gene structure analysis.

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12Q 1/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98117403.5

[43]公开日 2000 年 2 月 23 日

[11]公开号 CN 1245218A

[22]申请日 1998.8.19 [21]申请号 98117403.5

[71]申请人 中国人民解放军军事医学科学院放射医学研究所

地址 100850 北京市太平路 27 号院二所殷小刚转

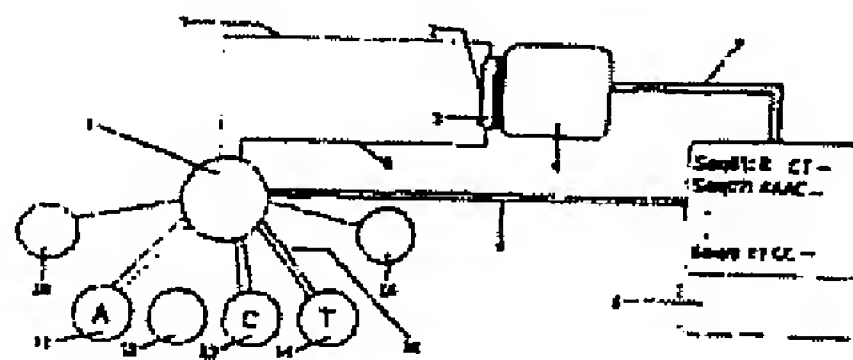
[72]发明人 王升启

权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 一种固相逐个碱基核酸分析方法和仪器

[57]摘要

本发明涉及一种与新的核酸序列分析技术,包括技术的方法原理和仪器,该技术原理与以往的核酸序列分析技术原理不同,它可实现核酸的大规模序列分析和突变检测等。该技术的实施对基因组计划的完成,遗传病分析,基因诊断和基因结构分析等研究领域具有重要的应用前景。



ISSN 1008-4274

权利要求书

1. 一种核酸序列分析新技术, 其特征在于, 模板和引物在固相反应, 引物或模板固定在一中固相载体上, 反应体系中加入聚合酶和适当的缓冲液, 每一种核苷酸分别放置在反应体系中, 依次在酶的催化下掺入到新合成的核酸链中, 核苷酸上标记有同位素或荧光物质等标记物, 每一种核苷酸每一次酶促反应后即进行掺入信号的检测, 检测可用同位素检测设备也可用荧光, 化学发光及显色等检测设备或技术; 具体操作时, 将已与测序引物结合的待测序模板固定在一中固相材料上, 依次加入含有酶、酶反应缓冲液及荧光物或同位素等标记 dNTPs 的 A、G、C 及 T 四种反应池中分别进行延伸反应, 每次更换反应池后对延伸反应后的模板进行洗涤并分析标记信号强度, 根据检测信号的变化即可分析出待测模板的序列. 如, 当加入 G 反应池后, 如测定的信号有增加说明模板一定是 C, 因为只有模板是 C, G 才能被酶掺入到新合成的 DNA 分子, 同时检测出荧光信号的增加, 而 A、C、T 均不能掺入, 因此无荧光信号的增加, 这样依次进行 A、G、C、T 四种循环反应, 每一种循环包括反应、洗涤和检测三步, 每一轮循环反应即可测定一个碱基序列, 当有多种模板同时固定在一中固相载体如芯片上时, 可对固定在载体上的所有模板同时测序.
2. 根据权利要求 1 中的技术, 其中固相载体可以是玻璃片、硅片、塑料片、纸片、多孔板或小塑料管等固相材料.
3. 根据权利要求 1 中的技术, 其中序列分析的核酸模板可以是 DNA/RNA.
4. 根据权利要求 1 中的技术, 其中可以采用引物与载体连接或模板与载体连接的途径; 模板或引物可以通过共价或非共价的方式与固相载体连接.
5. 根据权利要求 1 中的技术, 其中核苷酸可以是核糖核酸或脱氧核糖核酸, 其标记物可以是放射性标记或非放射性标记.
6. 根据权利要求 1 中的技术, 其中标记信号可采用 CCD 技术, 激光共聚焦显微技术, 荧光扫描技术或化学发光等进行检测, 也可采用放射性检测技术进行信号检测.
7. 根据权利要求 1 中的技术, 其中聚合酶可采用 DNA 聚合酶或 RNA 聚合酶.
8. 根据权利要求 1 中的技术可实现部分或全部自动化核酸序列分析操作(见附图 2); 该自动化仪器中各反应液(11-14)、洗涤液(10)及废液(15)

通过受数据处理装置(5)控制的多通道控制器及输液管路(6-7)送入反应腔(3)，反应液反应后送回原反应池(11-14)供以后反应用，洗涤液(10)则直接送至废液池(15)；洗涤液(10)可采用与反应池相同的缓冲体系；固定好模板的载体(2)置于一个可控温的密封反应腔(3)，然后再将其固定于 CCD 镜头或其它类似信号采集装置前，2 和 4 的距离可调整；信号采集装置(4)与计算机数据处理系统(5)连接。

9. 根据权利要求 8 中的仪器，其中 1 可采用电磁阀或数控泵。
10. 根据权利要求 8 中的仪器，其中 10-15 可以是金属或非金属材料制作的任何形状的可储液装置。
11. 根据权利要求 8 中的仪器，其中 4 可根据标记物的性质，采用同位素或非同位素数据采集装置。
12. 根据权利要求 8 中的仪器，其中 5 可以是计算机或其它数据处理装置。

说明书

一种固相逐个碱基核酸分析方法和仪器

本发明涉及生物化学和分子生物学领域，具体说涉及一种固相多模板逐个碱基核酸序列分析方法和仪器。

核酸序列分析不仅是核酸结构与功能研究的基础，同时，也是人类认识生命奥秘的关键。人类基因组计划(HGP)正是为实现这一目的而进行的一项伟大工程。核酸序列分析则是该工程的主体。根据原理，核酸序列分析可分五类：一是双脱氧法；二是化学法；三是杂交法(SBH)；四是质谱法；五是单分子法。目前通用的核酸序列分析技术主要是双脱氧法，该法的基本原理是以待测序列为模板采用四种双脱氧核苷在酶的作用下进行延伸-终止反应，产生一系列仅差一个碱基的合成DNA片段，通过电泳分离后，读出其测定模板的序列。双脱氧法可通过自动或手动完成，信号可采用同位素或荧光素标记分子。杂交法是通过标记DNA分子与固定在芯片上的寡核苷酸探针阵列杂交而实现的。化学降解法是利用碱基对特定化学试剂的敏感性差异对模板进行化学降解，电泳分离后分析出测定模板的序列。质谱法是利用质谱仪对酶法部分水解的核酸片段进行分析，根据片段组合计算出核酸的序列。单分子序列分析技术是将单分子DNA标记后固定在固相载体上，然后边酶解边分离和检测酶解的单核苷酸，从而测定出单分子DNA的序列，目前该技术仍处于研究阶段，距离实用还有很长的一段时间。上述方法虽各有特点，但仍然存在许多问题，如操作繁琐、分析样本数少、自动化程度低等。因此，并不太适合大规模核酸序列分析。研究开发新的大规模核酸序列分析技术仍是核酸序列分析工作面临的一个重要的课题。

本发明的目的提供一种新的大规模核酸序列分析方法和仪器。与以往技术比较，该技术具有原理新、灵敏度高、规模大、使用范围广和便于自动化等优点。

本发明的技术方案是通过以下原理实现的：

将已与测序引物结合的待测序模板固定在一块固相材料上，依次加入含有酶、酶反应缓冲液及荧光物或同位素等标记dNTPs的A、G、C及T四种反应池中分别进行延伸反应。每次更换反应池后对延

伸反应后的模板进行洗涤并分析标记信号强度，根据检测信号的变化即可分析出待测模板的序列。如，当加入 G 反应池后，如测定的信号有增加说明模板一定是 C，因为只有模板是 C，G 才能被酶掺入到新合成的 DNA 分子，同时检测出荧光信号的增加，而 A、C、T 均不能掺入，因此无荧光信号的增加，这样依次进行 A、G、C、T 四种循环反应，每一种循环包括反应、洗涤和检测三步，每一轮循环反应即可测定一个碱基序列。当有多种模板同时固定在一块固相载体如芯片上时，可对固定在载体上的所有模板同时测序。

结合附图进一步说明本发明的具体步骤如下：

图 1. 固相多模板逐个碱基核酸序列分析方法的原理

图 1 中各部件名称如下：

1: 固相载体； 2: 核酸序列分析模板 3: 核酸序列分析引物 4: 荧光/同位素标记 ATP； 5: 荧光/同位素标记 dGTP； 6: 荧光/同位素标记 dCTP； 7: 荧光/同位素标记 dTTP； 8: 掺入的荧光/同位素标记 dG； 9: 掺入的荧光/同位素标记 dA； 10: 掺入的荧光/同位素标记 dC； 11: 掺入的荧光/同位素标记 dT；

1. 模板固定

模板固定载体 1 可采用芯片、光导纤维、玻璃片、塑料片、纸片、多孔板等。模板 2 和引物 3 以氢键结合。1 与 2 的连接可采用共价或非共价的方法。

2. 延伸反应

根据模板多少、载体大小和种类、自动或手动方式不同可选择模板移动或反应池移动的延伸反应方式。延伸反应池应包括：合适的反应体系，相应的标记 dNTPs(4-7)，DNA 多聚酶(12)等。DNA 多聚酶可以是逆转录酶、耐高温酶、T7、T4、Klenow 等。酶的浓度，缓冲体系中各种离子的浓度，引物浓度，dNTPs 的浓度等可进行优化。

3. 信号标记

dNTPs(4-7)的信号标记是该技术的最关键环节。可采用荧光染料或同位素标记。荧光染料标记无同位素问题，便于自动化。但可能的问题是掺入率、位阻及荧光信号饱和及淬灭。掺入率可通过以下途径解决：选择合适的荧光标记染料；加入适量相应的非标记 dNTP；荧光信号饱和的问题可通过改进仪器设计、减少模板或标记 dNTP 用量，及信号淬

灭的途径解决。相邻标记 dNTP 间荧光淬灭的问题可通过选择发射和吸收波长相差较大的荧光标记物。利用淬灭还可在一定程度上解决饱和的问题。同位素标记突出的特点是不存在位阻问题。不利因素是相应的同位素问题。

4. 信号检测及处理

荧光信号检测可用 CCD 技术, 荧光扫描成像技术, 荧光多孔板检测技术, 激光共聚焦显微技术等。同位素信号的检测采用相应的检测技术及设备即可。上述检测技术最好能定量, 特别是大片段测序, 小片段可不用定量, 采用本底校正即可。信号处理可采用计算机及配套分析软件。

5. 自动化仪器

与其它自动测序技术比较该技术更易实现自动化分析。结合图 2 说明如下:

图 2. 固相多模板逐个碱基核酸序列分析仪器

图 2 中各部件名称如下:

1: 多通道控制器; 2: 固相载体; 3: 反应腔 4: 信号采集装置; 5: 数据转换和处理装置; 6-7: 反应液输入/输出管路; 8-9: 数据传输电缆; 10: 洗涤液; 11: 荧光/同位素等标记 dATP; 12: 荧光/同位素等标记 dGTP; 13: 荧光/同位素等标记 dCTP; 14: 荧光/同位素等标记 dTTP;

各反应液(11-14)、洗涤液(10)及废液(15)通过受数据处理装置(5)控制的多通道控制器及输液管路(6-7)送入反应腔(3), 反应液反应后送回原反应池(11-14)供以后反应用, 洗涤液(10)则直接送至废液池(15)。洗涤液(10)可采用与反应池相同的缓冲体系。固定好模板的载体(2)置于一个可控温的密封反应腔(3), 然后再将其固定于 CCD 镜头或其它类似信号采集装置前。信号采集装置(4)与计算机数据处理系统(5)连接。

本发明具有以下特点:

1. 原理新: 不用双脱氧核苷、不用进行电泳、不用制备单链分子、不用化学降解、不用制备寡核苷酸芯片
2. 灵敏度高: 由于充分利用了模板, 因此灵敏度可大大提高, 理论上 ng 模板即可。
3. 适用范围广: 可测定紧接引物的核酸序列及重复序列。



4. 规模大：可同时测定大量的 DNA 序列，理论上在载体上可以固定多少种模板，就可同时测定多少序列。
5. 便于自动化：结合 CCD 技术及自动杂交等技术即可实现大规模自动化分析。

实施例：

说明书附图

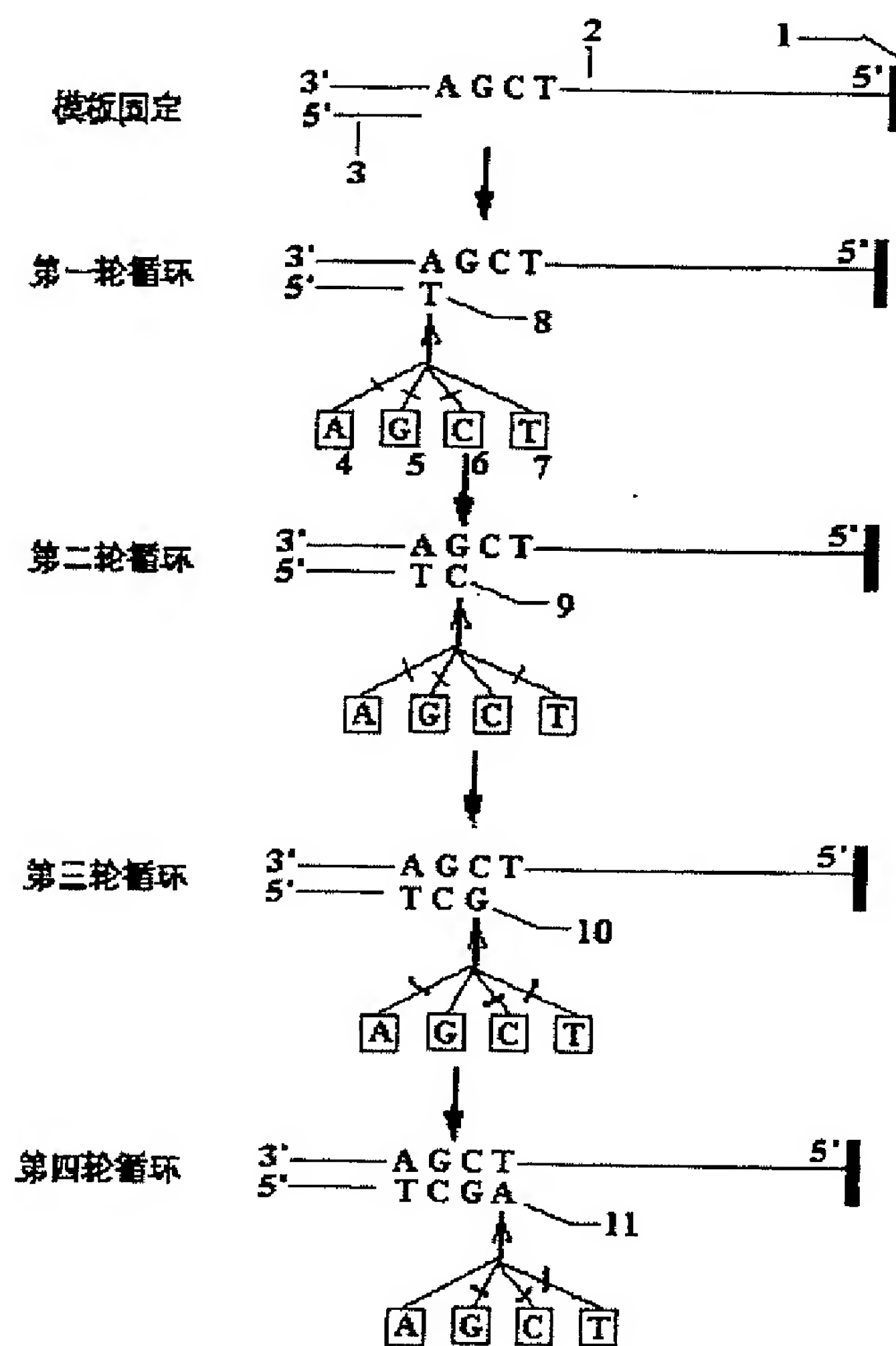


图1

说明书附图

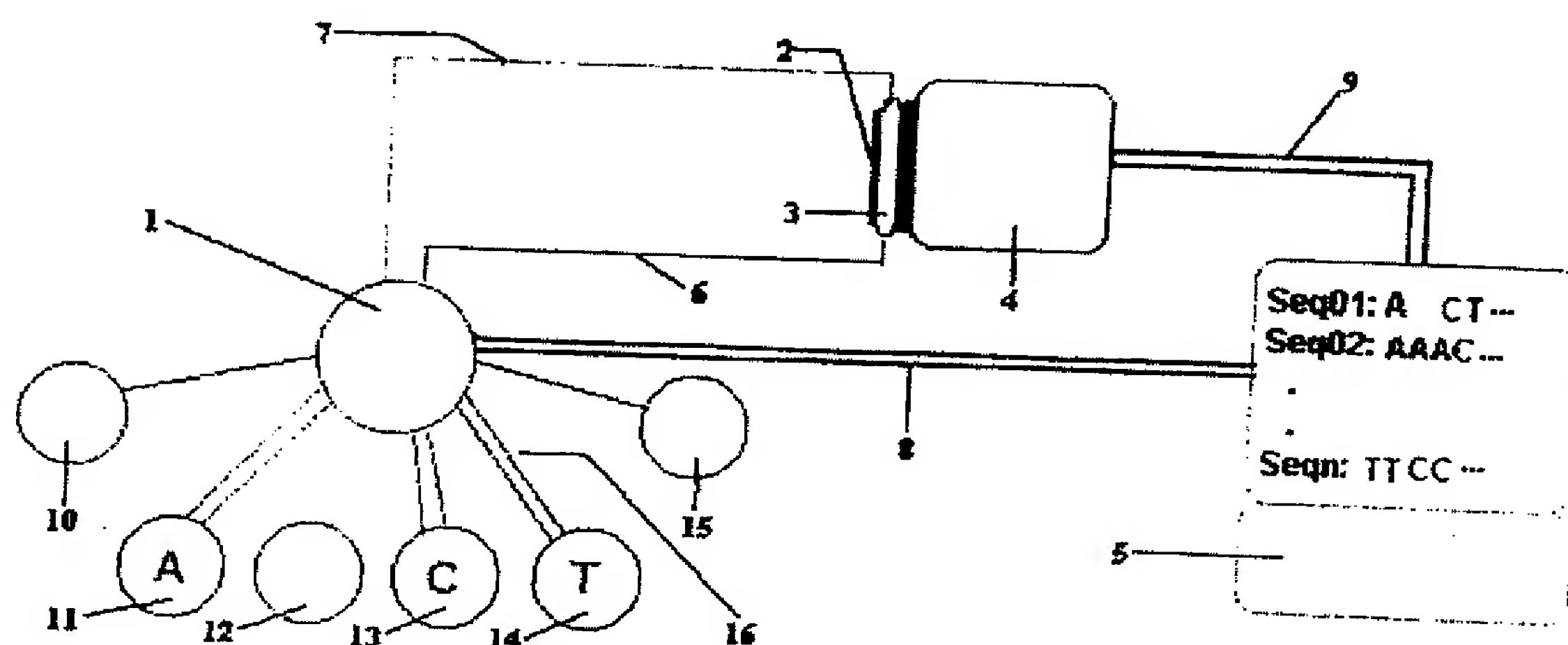


图 2

1) Family number: 12718685 (CN1245218 A)

Title:	Solid-phase one-by-one base nucleic acid analysis method and its instrument			
Family:	Publication number	Publication date	Application number	Application date
	CN1245218 A	20000223	CN19981017403	19980819

Assignee(s):(std): INST OF RADIO MEDICINE ACADEMY

Assignee(s): INST OF RADIO MEDICINE ACADEMY OF MILITARY

Inventor(s):(std): WANG SHENGQI

Inventor(s): SHENGQI WANG

International class (IPC 8): C12Q1/00 (Advanced/Invention);
C12Q1/60 (Core/Invention)

International class (IPC 1-7): C12Q1/00

Abstract:
Source: CN1245218A The present invention relates to a new nucleic acid sequence analysis technique, principle and equipment, which are different from existing ones in that it can realize large-scale sequence analysis of nucleic acid and mutation detection. Said technique has important application prospect in genome project, heritable disease analysis, gene diagnosis and gene structure analysis.